

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-256388

(43)Date of publication of application : 19.09.2000

(51)Int.Cl.

C07H 21/04
C01B 33/12
C07H 21/02
C12M 1/00
C12N 15/09
// C01G 49/00

(21)Application number : 11-063329

(71)Applicant : JSR CORP

(22)Date of filing : 10.03.1999

(72)Inventor : MASUKAWA TORU
HIKATA MIKIO
HAN KAKUN

(54) MAGNETIC SILICA PARTICLE FOR NUCLEIC ACID BINDING AND ISOLATION OF NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a magnetic silica particle having excellent dispersion stability and magnetic separation, isolatable from a material containing a nucleic acid in high efficiency and with high purity, useful for nucleic acid binding in high productivity and to provide a method capable of isolating a nucleic acid from the material containing the nucleic acid in high efficiency and with high purity.

SOLUTION: The magnetic silica particle contains a metal or a metal oxide composed of a multidomain and has ≥ 0.1 m²/g and < 100 m²/g specific surface area. The method for isolating a nucleic acid comprises a process for bringing the magnetic silica particle into contact with a material containing a nucleic acid in a solution for extracting the nucleic acid so as to bond the nucleic acid to the surface of the magnetic silica particle for nucleic acid binding, a process for separating the magnetic silica particle for nucleic acid binding bonded to the nucleic acid from the solution for extracting the nucleic acid by magnetism, and a process for dissociating the nucleic acid bound with the magnetic silica particle for nucleic acid binding from the magnetic silica particle for nucleic acid binding.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-256388
(P2000-256388A)

(43) 公開日 平成12年9月19日 (2000.9.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04	A 4 B 0 2 4
C 0 1 B 33/12		C 0 1 B 33/12	A 4 B 0 2 9
C 0 7 H 21/02		C 0 7 H 21/02	4 C 0 5 7
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 G 0 0 2
C 1 2 N 15/09		C 0 1 G 49/00	A 4 G 0 7 2
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-63329	(71) 出願人	000004178 ジェイエスアール株式会社 東京都中央区築地2丁目11番24号
(22) 出願日	平成11年3月10日 (1999.3.10)	(72) 発明者	増川 亨 東京都中央区築地2丁目11番24号 ジェイエスアール株式会社内
		(72) 発明者	日方 幹雄 東京都中央区築地2丁目11番24号 ジェイエスアール株式会社内
		(74) 代理人	100078754 弁理士 大井 正彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 核酸結合用磁性シリカ粒子および核酸単離方法

(57) 【要約】

【課題】 分散安定性および磁気分離性に優れ、核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができ、生産性の高い核酸結合用磁性シリカ粒子を提供すること。核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができる方法を提供すること。

【解決手段】 本発明の磁性シリカ粒子は、多磁区からなる金属または金属酸化物を含有してなり、比表面積が $0.1 \text{ m}^2 / \text{g}$ 以上 $100 \text{ m}^2 / \text{g}$ 未満であることを特徴とする。本発明の核酸単離方法は、核酸抽出用溶液中において、上記の磁性シリカ粒子と核酸を含有する材料とを接触させることにより、核酸結合用磁性シリカ粒子の表面に核酸を結合する工程と、核酸が結合した核酸結合用磁性シリカ粒子を磁気によって核酸抽出用溶液から分離する工程と、核酸結合用磁性シリカ粒子に結合した核酸を核酸結合用磁性シリカ粒子から解離させる工程とを有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多磁区からなる金属または金属酸化物を含有してなり、比表面積が $0.1 \text{ m}^2 / \text{g}$ 以上 $100 \text{ m}^2 / \text{g}$ 未満であることを特徴とする核酸結合用磁性シリカ粒子。

【請求項2】 多磁区からなる金属または金属酸化物よりなる複数の芯微粒子が、珪素酸化物よりなる被膜または微粒子によって覆われてなることを特徴とする請求項1に記載の核酸結合用磁性シリカ粒子。

【請求項3】 カオトロピック物質溶液中において、核酸と特異的に結合し、水または低濃度の塩溶液中において、結合した核酸が解離する性質を有することを特徴とする請求項1または請求項2に記載の核酸結合用磁性シリカ粒子。

【請求項4】 核酸抽出用溶液中において、請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の核酸結合用磁性シリカ粒子と核酸を含有する材料とを接触させることにより、当該核酸結合用磁性シリカ粒子の表面に核酸を結合する工程と、核酸が結合した核酸結合用磁性シリカ粒子を磁気によって核酸抽出用溶液から分離する工程と、核酸結合用磁性シリカ粒子に結合した核酸を当該核酸結合用磁性シリカ粒子から解離させる工程とを有することを特徴とする核酸単離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸結合用磁性シリカ粒子および核酸単離方法に関し、さらに詳しくは多磁区からなる金属または金属酸化物を含有し、核酸を含む検体、試料、材料から核酸を抽出して精製するためあるいは核酸増幅産物を精製するために使用される診断薬担体、細胞分離担体、核酸分離担体、固定化酵素担体などとして好適な核酸結合用磁性シリカ粒子およびこの磁性シリカ粒子を用いた核酸単離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、核酸を含有する材料例えば生体サンプルから核酸を単離する方法として、核酸が結合し得る粒子を用い、適宜の核酸抽出用溶液中において、この粒子の表面に生体サンプル中の核酸を結合させ、核酸が結合した粒子を回収した後、適宜の核酸解離用液中において、核酸が結合した粒子から当該核酸を解離させる方法が知られており、例えば、特公平7-13077号公報には、シラン化剤により表面が変性されたシリカゲル粒子などの多孔質マトリックスを用いた長鎖の核酸の単離方法が開示されている。

【0003】また、最近においては、核酸を単離するために用いられる粒子として、磁力によって容易に回収することが可能であることから、磁性を有するものが用いられており、例えば超常磁性酸化鉄からなる芯微粒子の表面に、核酸などが共有結合し得る重合性シランからなる被膜が形成されてなる磁性シリカ粒子が知られてい

る。

【0004】かかる磁性シリカ粒子においては、高い核酸の抽出効率を得られる点で、比表面積が大きいものが好ましく、このような比表面積の大きい粒子としては、粒子径の小さいものおよび多孔質のものが挙げられる。然るに、粒子径の小さい磁性シリカ粒子は、当然のことながら磁性体の絶対量が少ないものであるため、磁力によって回収するために相当に長い時間が必要となる。従って、核酸を単離するために用いられる磁性シリカ粒子としては、一般に、多孔質のものが用いられており、例えば特開平9-19292号公報には、多孔質超常磁性シリカ粒子よりなる核酸結合用担体が開示されている。

【0005】しかしながら、このような多孔質の磁性シリカ粒子においては、次のような問題がある。

(1) 多孔質の磁性シリカ粒子においては、実際の生体サンプルから遊離される核酸が粒子の細孔内に進入する過程は拡散支配のため相当に長い時間を要する。従って、核酸を磁性シリカ粒子に短時間で結合させることは困難である。また、核酸が粒子の細孔内の全域にわたって進入しないため、磁性シリカ粒子にその比表面積に応じた量の核酸を結合させることは困難である。

(2) 磁性シリカ粒子の細孔内における表面に結合した核酸を解離させるためには、当該粒子の細孔内に核酸解離用液を十分に供給しなければならず、そのため、核酸解離用液を数回にわたって交換することが必要となる結果、高い効率で核酸を回収することが困難である。

(3) 多孔質の磁性シリカ粒子の製造は、一般的に複雑で、高温による焼結工程が必要となるため、再現性の良い粒子の大量生産が困難であり、また品質管理も煩雑となるため、高い生産性が得られない。

(4) 超常磁性体は、通常の強磁性体に比べて磁気応答性が10分の1～1000分の1程度である。従って、核酸抽出用溶液から磁性シリカ粒子を短時間で分離・回収するためには、当該磁性シリカ粒子として、粒子径が大きくて超常磁性体の含有量が大きいもの、すなわち比表面積の小さいものを用いることが必要となり、結局、高い効率で核酸を単離することが困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、以上のような事情に基づいてなされたものであって、その目的は、分散安定性および磁気分離性に優れ、核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができ、しかも、生産性の高い核酸結合用磁性シリカ粒子を提供することにある。本発明の他の目的は、核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができる方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、超常磁性金属酸化物の代わりに多磁区からなる金属または金属酸化物を含

有してなる非多孔質の磁性シリカ粒子を用いることにより、核酸を含有する材料から当該核酸を単離する際に、優れた磁気分離性および核酸抽出性が得られることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は、多磁区からなる金属または金属酸化物を含有してなり、比表面積が $0.1\text{ m}^2/\text{g}$ 以上 $100\text{ m}^2/\text{g}$ 未満であることを特徴とする。

【0009】本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子においては、多磁区からなる金属または金属酸化物よりなる複数の芯微粒子が、珪素酸化物よりなる非多孔質の被膜または微粒子によって覆われてなるものであってもよい。また、本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子においては、カオトロピック物質溶液中において、核酸と特異的に結合し、水または低濃度の塩溶液中において、結合した核酸が解離する性質を有するものであることが好ましい。

【0010】本発明の核酸単離方法は、核酸抽出用溶液中において、請求項1または請求項2に記載の核酸結合用磁性シリカ粒子と核酸を含有する材料とを接触させることにより、当該核酸結合用磁性シリカ粒子に核酸を結合させる工程と、核酸が結合した核酸結合用磁性シリカ粒子を磁気によって核酸抽出用溶液から分離する工程と、核酸結合用磁性シリカ粒子に結合した核酸を当該核酸結合用磁性シリカ粒子から解離させる工程とを有することを特徴とする。

【0011】本発明の核酸単離方法においては、前記核酸抽出用溶液は、カオトロピック物質を含有してなるものであることが好ましい。また、水または低濃度の塩溶液中において、核酸結合用磁性シリカ粒子から核酸を解離させることが好ましい。このような方法により回収された核酸は、そのまま分子生物学の実験材料として使用することができる。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は、多磁区からなる金属または金属酸化物が含有された、好ましくは非多孔質のシリカ粒子よりなるものである。この磁性シリカ粒子の具体的構造は特に限定されるものではないが、基本的には、多磁区からなる強磁性金属または金属酸化物よりなる複数の芯微粒子が、珪素酸化物よりなる被膜または微粒子によって覆われてなるものである。

【0013】本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は、その比表面積が $0.1\text{ m}^2/\text{g}$ 以上 $100\text{ m}^2/\text{g}$ 未満、好ましくは $0.5\sim 50\text{ m}^2/\text{g}$ とされる。比表面積が $0.1\text{ m}^2/\text{g}$ 未満である場合には、単位重量当たりの核酸の結合量が小さいため、高い効率で核酸を単離することが困難となる。一方、比表面積が $100\text{ m}^2/\text{g}$ 以上の粒子は、粒子径が小さいものであるため、個々の粒子の多磁区磁性体の含有量が少なくても良好な磁気分離性

が得られない。

【0014】本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子に用いられる多磁区からなる金属または金属酸化物（以下、「多磁区磁性体」ともいう。）は、強磁性体、軟強磁性体または反強磁性体であって、通常それ自体磁気を示さないが、磁場において感磁させることによって、それ自体が磁石のように磁気を示す性質を有するものである。このような多磁区磁性体としては、例えば四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）、 γ -重三二酸化鉄（ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ）等の各種フェライト、鉄、マンガン、コバルト、クロムなどの金属またはこれらの金属の合金などを用いることができる。また、多磁区磁性体としては、その径が $15\sim 100\text{ nm}$ 、特に $20\sim 80\text{ nm}$ のものであることが好ましい。この径が 15 nm 未満である場合には、単磁区磁性体となるため、磁場に感磁させても、残留磁化がほとんど生じないため好ましくない。一方、この径が 100 nm を超える場合には、残留磁化が強すぎるため、一旦感磁させると、粒子同士の磁気結合が強すぎて通常の回転・振動操作では、結合した粒子同士を分離することが困難となり、粒子の良好な分散性が得られないため好ましくない。

【0015】本発明の磁性シリカ微粒子の磁気特性としては、 15000 オステッド（ Oe ）の磁場において感磁させたときに、保磁力が $50\sim 2000\text{ Oe}$ 、特に $100\sim 1000\text{ Oe}$ であることが好ましく、残留磁束密度が $1.0\sim 70\text{ emu/g}$ 、特に $2\sim 20\text{ emu/g}$ であることが好ましい。保磁力が 50 Oe 未満である場合または残留磁束密度が 1 emu/g 未満である場合には、天然磁石（磁束密度が例えば $1000\sim 4000\text{ Gauss}$ ）によって感磁させても、粒子間に十分に大きい磁力が作用しないため、当該天然磁石によって粒子を高い効率で分離・回収することが困難となり、実用上好ましくない。一方、保磁力が 2000 Oe を超える場合または残留磁束密度が 70 emu/g を超える場合には、粒子間に作用する磁力が過大となるため、粒子を分離・回収した後、再分散することが困難となる。

【0016】本発明の磁性シリカ粒子においては、多磁区磁性体の含有割合は、粒子全体の 20 重量%以上、特に $30\sim 99$ 重量%であることが好ましい。この割合が 20 重量%未満である場合には、当該磁性シリカ粒子には、良好な磁気分離性が得られず、その結果、後述する核酸の単離方法において、核酸抽出用溶液から磁性シリカ粒子を分離するために相当に長い時間を要するので、高い時間的効率が得られず、好ましくない。

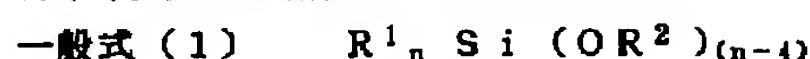
【0017】また、本発明の磁性シリカ粒子においては、少なくとも粒子表面に珪素元素が露出していることが必要であり、具体的には、珪素元素の表面存在比率が 10% 以上、特に 15% 以上であることが好ましい。この珪素元素は、シリカ（ SiO_2 ）、シラノール（ SiOH ）またはシロキサンとして粒子表面に露出している

もよい。本発明の磁性シリカ粒子における珪素元素の表面存在比率は、E S C A（化学分析電子分光法）によって測定することができる。また、珪素酸化物よりなる被膜の厚みまたは微粒子の粒子径は、特に限定されるものではなく、芯微粒子の表面全体が被膜または微粒子によって覆われていればよい。

【0018】本発明の磁性シリカ粒子は、その平均粒子径が、0.05～20 μ m、特に0.1～10 μ mであることが好ましい。平均粒子径が0.05 μ m未満である場合には、多磁区磁性体の含有量が小さいものとなるため、良好な磁気分離性が得られず、その結果、後述する核酸単離方法において、核酸抽出用溶液から粒子を分離するために相当に長い時間を要するので、高い時間的効率が得られず、好ましくない。一方、平均粒子径が20 μ mを超える場合には、粒子の比表面積が相対的に小さくなって、粒子の単位重量当たりの核酸の結合量が著しく低下するため、好ましくない。また、平均粒子径が20 μ mを超える粒子は、当該粒子の自然沈降が無視することができないほど発生するため、後述する核酸単離方法において、磁性シリカ粒子と核酸とを結合させる際に、短時間で例えば数分間で粒子が沈降する結果、高い効率が得られず、好ましくない。

【0019】本発明の磁性シリカ粒子の形状は、特に限定されず、球状、棒状、その他の形状であってもよく、後述する製造方法において、珪素アルコキシドの反応条件を選択することにより、粒子の形状を制御することができる。

【0020】このような本発明の磁性シリカ粒子は、例えば多磁区磁性体よりなる芯微粒子を調製し、複数の芯微粒子を、珪素酸化物よりなる被膜または微粒子によって覆うことにより、製造することができる。このような方法によれば、芯微粒子は、得られる磁性シリカ粒子の



(式中、 R^1 および R^2 は置換または無置換の1価の炭化水素基を示し、

n は0～3の整数である。)

【0025】基 R^1 および基 R^2 の具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ビニル基、フェニル基などの1価の炭化水素基およびこれらの基における水素原子がハロゲン原子またはアミノ基で置換された置換炭化水素基を挙げることができる。

【0026】珪素アルコキシドの具体例としては、テトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン、テトライソプロポキシシラン、テトラブトキシシラン、メチルトリメトキシシラン、メチルトリエトキシシラン、アミノフェニルトリメトキシシラン、アミノプロピルトリメトキシシラン、N-2-アミノエチル-3-アミノプロピルトリメトキシシランなどが挙げられる。これらの中では、テトラアルコキシド（一般式(1)において n の値が0のもの）が好ましい。

内部にも点在し、表面には露出していない状態が達成される。多磁区磁性体よりなる芯微粒子は、気相法により調製することができる。気相法による調製方法としては、公知の方法を利用することができ、例えば、不活性ガス中蒸発法、プラズマ中蒸発法、水素プラズマ反応法、気相化学反応法などが挙げられる。

【0021】不活性ガス中蒸発法による調製方法の一例を示すと、以下の通りである。ベンジャー内をその気圧が例えば 10^{-3} Torrになるまで排気し、次いで、ベンジャー内に数Torr～数十Torrの不活性ガスを導入する。その後、当該ベンジャー内において、多磁区磁性体材料を加熱して蒸発させ、この蒸気を冷却板によって冷却することにより、多磁区磁性体よりなる芯微粒子が得られる。この芯微粒子の一次平均粒子径は、例えば15～100 μ mである。

【0022】多磁区磁性体よりなる芯微粒子を珪素酸化物よりなる被膜または微粒子によって覆う方法としては、芯微粒子を珪素アルコキシドまたはその溶液中に分散した後、当該珪素アルコキシドを加水分解および縮合することにより、当該芯微粒子の表面に被膜または微粒子を形成する方法、いわゆるゾルーゲル法を利用することができる。具体的に説明すると、まず、多磁区磁性体よりなる芯微粒子を珪素アルコキシドまたはその溶液に添加し、超音波分散機などによって芯微粒子を十分に分散させ、次いで、得られた分散液を十分に攪拌しながら、当該分散液に水および触媒を添加して珪素アルコキシドの加水分解反応および縮合反応を行う。

【0023】ここで、珪素アルコキシドとしては、下記一般式(1)で表される構造を有するものを用いることが好ましい。

【0024】

【化1】

【0027】以上において、珪素アルコキシドの使用割合は、芯微粒子100重量部に対して金属アルコキシドが1～1000重量部、特に30～500重量部であることが好ましい。珪素アルコキシドの割合が1重量部未満である場合には、芯微粒子の表面に均一に被膜または微粒子を形成することが困難となる。一方、珪素アルコキシドの割合が1000重量部を超える場合には、芯微粒子を含有しないシリカ粒子が多量に発生するため、好ましくない。

【0028】また、上記の珪素アルコキシドの代わりに、これらが縮合されてなるオリゴマーを用いることもできる。このようなオリゴマーを用いる場合には、ポリスチレン換算の重量平均分子量が500～10000のものが好ましい。このオリゴマーは、直鎖状、分枝状ま

たは環状構造のいずれであってもよく、その分子鎖末端が、例えば水素基、アルコキシ基、トリメチルシリル基、ジメチルビニルシリル基、メチルフェニルビニルシリル基、メチルジフェニルシリル基で封鎖されていてもよい。

【0029】珪素アルコキシド溶液を調製するための有機溶媒としては、アルコール類、ケトン類、エステル類などを用いることができる。その具体例としては、エタノール、メタノール、イソプロパノール、ブチルアルコール、ジオキサン、アセトン、メチルエチルケトンなどが挙げられる。これらは単独または2種以上を混合して用いることができる。これらの有機溶媒の使用割合は、珪素アルコキシド100重量部に対して0～1000重量部である。

【0030】珪素アルコキシドの加水分解に用いられる水の使用割合は、珪素アルコキシド100重量部に対して、好ましくは1～5000重量部、さらに好ましくは10～2000重量部である。この割合が1重量部未満である場合には、加水分解反応が迅速に進行しないため、当該磁性シリカ粒子の製造において高い時間的効率が得られず、実用的ではない。一方、この割合が5000重量部を超える場合には、芯微粒子を含有しないシリカ粒子が多量に発生するため、好ましくない。また、水は、そのまま分散液に添加してもよく、また、上記の有機溶媒と混合して分散液に添加してもよい。

【0031】触媒としては、ルイス酸や塩基などを用いることができ、具体的には、塩酸などの無機酸化合物、酢酸などの有機酸化合物、アンモニアなどの無機塩基化合物、エタノールアミンなどの有機アミン化合物などを用いることができる。触媒の使用割合は、珪素アルコキシド100重量部に対し、好ましくは0.01～100重量部、さらに好ましくは0.2～50重量部である。

【0032】このような方法によれば、得られる磁性シリカ粒子は多孔質のものとなるため、有用である。

【0033】本発明の磁性シリカ粒子は、カオトロピック物質の存在下で核酸と結合する性質を有すると共に、水または低濃度の塩溶液中において、結合した核酸を解離する性質を有するものである。このような性質を利用して、核酸を含有する材料（以下、「核酸含有材料」という。）から当該核酸を単離することができる。

【0034】核酸含有材料としては、例えば、細胞、バクテリア、ファージ、ウイルスを含む検体、培養液、または組織を砕いた溶液などの生体サンプル、生体材料が挙げられる。これらの生体サンプル、生体材料中には、核酸の他に、蛋白質、膜、脂質、糖等が含まれている。また、核酸含有材料から単離する対象となる核酸には、ゲノムDNA、プラスミッドDNA、RNA、合成DNAまたはPCR法による増幅反応産物等が含まれる。

【0035】そして、本発明においては、上記の核酸結合用磁性シリカ粒子を用い、以下の工程（イ）～工程

（ハ）を経由することにより、核酸含有材料から核酸を単離することができる。

【0036】〔工程（イ）〕この工程（イ）は、核酸結合用シリカ粒子および核酸含有材料を核酸抽出用溶液中において接触させることにより、当該核酸結合用磁性シリカ粒子に核酸を結合する工程である。

【0037】核酸抽出用溶液としては、カオトロピック物質を含有してなるものを用いることが好ましい。このような核酸抽出用溶液においては、核酸含有材料中における核酸のみが高い純度で磁性シリカ粒子に結合される。ここで、「カオトロピック物質」とは、一般的に水の構造を破壊する力を有するものであり、その具体例としては、グアニジン塩、イソチオシアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、尿素、過酸化塩酸ナトリウム、過酸化クロム酸ナトリウム等が挙げられる。これらのカオトロピック物質は、単独でまたは2種以上を組み合わせて用いることができる。

【0038】核酸抽出用溶液におけるカオトロピック物質の割合は、1～10モル／リットルであることが好ましい。この割合が1モル／リットル未満である場合には、核酸とシリカ磁性粒子との吸着力が小さいため、十分に核酸を回収することが困難となる。一方、この割合が10モル／リットルを超える場合には、核酸抽出用溶液（カオトロピック物質溶液）の調製および保存に不便が生じ、また、実用上のメリットもないため好ましくない。

【0039】また、核酸抽出用溶液には、カオトロピック物質の他に、種々の塩が添加されていてもよい。さらに、核酸抽出用溶液は、緩衝液として調製されていてもよく、このような緩衝液の具体例としては、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含有する緩衝液等が挙げられる。

【0040】磁性シリカ粒子と核酸含有材料との接触は、通常、両者を核酸抽出用溶液中において混合することにより行われる。磁性シリカ粒子および核酸含有材料を混合する手段としては、ボルテックスミキサー、振動攪拌機、回転攪拌機などを用いることができる。また、混合時間は、通常5～30分間である。

【0041】〔工程（ロ）〕この工程（ロ）は、核酸が結合した磁性シリカ粒子を磁気によって核酸抽出用溶液から分離する工程であり、この工程（ロ）においては、核酸抽出用溶液中に分散された磁性シリカ粒子が磁化されることによって、例えば糸状の擬似凝集体が形成され、その結果、磁気分離性を数倍促進することになると共に、ゆるやかな振動・回転操作により、擬似凝集体における個々の粒子を容易に分離することができる。また、必要に応じて、吸着された核酸を、カオトロピック物質溶液、またはエタノール等の核酸が溶解しない液体により数回洗浄することが好ましい。

【0042】〔工程（ハ）〕この工程（ハ）は、核酸結

合用磁性シリカ粒子に結合した核酸を当該核酸結合用磁性シリカ粒子から解離させる工程である。核酸結合用磁性シリカ粒子からの核酸の解離は、核酸解離用液中において例えば攪拌しながら行われる。このような核酸解離用液としては、水または低濃度の塩を含む緩衝液を用いることが好ましく、その具体例としては、10 mM トリス緩衝液、10 mM リン酸緩衝液または滅菌蒸留水などが挙げられる。核酸を解離させるための処理時間は、通常1～30分間であり、処理温度は、通常25～60℃である。

【0043】以上のようにして単離された核酸は、純度の高いものであるため、そのままの状態での核酸増幅法をはじめとする遺伝子解析に使用することができる。

【0044】本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は、後述する実施例から明らかなように、磁束密度が数百から数千ガウスの磁石によって、当該磁性シリカ粒子の分散液から容易に分離・回収することができ、しかも、容易に再分散させることができ、優れた磁気分離性および分散安定性の両方を有するものである。また、本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は非多孔質であるため、その表面全体に短時間で核酸と結合させることができると共に、結合した核酸を短時間で解離させることができ、しかも、比表面積が特定の範囲にあるため、単位重量当たりの核酸の結合量が大きいものである。このような本発明の磁性シリカ粒子によれば、核酸含有材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができ、その再現性も極めて良好である。

【0045】また、非多孔質の磁性シリカ粒子を構成することにより、その製造において、高温による焼結工程が不要となる結果、大量生産が可能であり、しかも、品質管理も容易であり、高い生産性を有するものである。

【0046】

【実施例】以下、本発明の具体的な実施例について説明する。以下の実施例において、磁性シリカ粒子の平均粒子径、比表面積、残留磁化および保持力は、次のようにして測定した。

〔平均粒子径〕透過型電子顕微鏡により磁性シリカ粒子の電子顕微鏡写真を撮影し、無作為に選んだ500個以上の磁性シリカ粒子の粒子径を測定して数平均粒子径を求めた。

〔比表面積〕窒素ガス中における吸脱着曲線をBETプロット方式で求め、比表面積を測定した。

〔残留磁化および保磁力〕振動試料型磁力計より測定した、最大印加磁場が15000 Oeにおける磁性シリカ粒子のヒステリシスループより、残留磁化および保磁力を求めた。

〔珪素元素の表面存在比率〕ESCA（化学分析電子分光法）によって珪素元素の表面存在比率を測定した。

【0047】〈実施例1（磁性シリカ粒子の調製）〉多磁区磁性体としてフェライト〔シーアイ化成製、1次粒

子径0.02 μm〕100重量部を、脱水エタノール600重量部とテトラエトキシシラン100重量部との混合溶液に添加し、当該多磁区磁性体を超音波分散機により十分に分散させた後、この分散液を反応器に仕込み、十分に攪拌しながら、アンモニア10重量部を溶解した蒸留水2000部を30分かけて滴下し、テトラエトキシシランの加水分解および縮合を行うことにより、本発明の磁性シリカ粒子Aを調製した。

【0048】この磁性シリカ粒子Aの1重量%分散液を調製し、この分散液を1.5ミリリットルチューブに入れ、磁束密度が1000ガウスの磁石を設置したところ、磁石を設置してから10秒間で分散液が磁性シリカ粒子と透明な上澄み液とに分離し、当該磁性シリカ粒子Aを磁石によって容易に分離・回収することができるものであることが確認された。また、回収された磁性シリカ粒子Aは、水中に容易に再分散できるものであった。

【0049】そして、得られた磁性シリカ粒子Aについて、蒸留水中に分散させた後、磁石によって分離・回収する操作を合計3回行うことにより、当該磁性シリカ粒子Aを洗浄・精製した。この磁性シリカ粒子Aは非多孔質であって、その平均粒子径は0.3 μm、残留磁化は2 emu/g、保磁力は2800 e、比表面積は25 m²/g、珪素元素の表面存在率は19%であった。

【0050】〈実施例2（磁性シリカ粒子の調製）〉多磁区磁性体としてフェライト〔鈴木油脂工業製、1次粒子径3.1 μm〕を用いたこと以外は実施例1と同様にして本発明の磁性シリカ粒子Bを調製した。この磁性シリカ粒子Bは、その平均粒子径は5.6 μm、残留磁化は7 emu/g、保磁力は2100 e、比表面積は81 m²/g、珪素元素の表面存在率は20%であった。

【0051】〈実施例3（磁性シリカ粒子の調製）〉アンモニア10重量部の代わりに1 N 塩酸10重量部を用いたこと以外は実施例1と同様にして本発明の磁性シリカ粒子Cを調製した。この磁性シリカ粒子Cは、その平均粒子径は0.4 μm、残留磁化は3 emu/g、保磁力は2750 e、比表面積は23 m²/g、珪素元素の表面存在率は22%であった。

【0052】〈実施例4（核酸含有材料からの核酸の単離）〉実施例1で得られた磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液を調製し、この分散液0.1ミリリットルを、低純度 Salmon sperm DNAを150 μg含む血清0.1ミリリットルおよび4 M NaClO₄/2 M グアニジン塩酸塩溶液（核酸抽出用溶液）1ミリリットルに添加し、室温で10分間攪拌混合した。その後、磁束密度が2500ガウスの磁石を用いて、核酸抽出用溶液から磁性シリカ粒子Aを分離・回収した。回収した磁性シリカ粒子Aを蒸留水0.1ミリリットルに分散させ、ボルテックスミキサーにより1分間攪拌した後、磁性シリカ粒子Aを磁石により分離させ、溶液を回収した。

【0053】この溶液の吸収スペクトルを測定したところ、DNA由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度(A_{260})の値から、当該溶液には、96 μ gのDNAが含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度(A_{260})と波長280nmにおける吸光度(A_{280})との比(A_{260}/A_{280})〕は2.0であった。さらに、単離されたDNAを1.4%アガロースゲル中において電気泳動し、エチジウムブロコイドにより染色し、長さ約50~20KbpのDNAのスメアーバンドの存在を確認した。

【0054】〈実施例5(核酸含有材料からの核酸の単離)〉10⁷培養細胞(HeLa)溶液を、300rpm、10分間の条件で遠心分離処理し、その上澄み除去した。得られた固形物(細胞ペレット)に3MNaClO₄/2Mクアニジウムチオシアネート溶液(核酸抽出用溶液)1ミリリットルを添加した後、ボルテックスミキサーにより3分間攪拌し、次いで、実施例4と同様にして調製した磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液0.1ミリリットルを添加し、室温で10分間攪拌混合した。その後、実施例4と同様にして核酸抽出用溶液から磁性シリカ粒子Aを分離・回収した。回収した磁性シリカ粒子Aを1MNaClO₄溶液で洗浄した後、蒸留水0.1ミリリットルに分散させ、ボルテックスミキサーにより1分間攪拌した後、磁性シリカ粒子Aを磁石により分離させ、溶液を回収した。

【0055】この溶液の吸収スペクトルを測定したところ、核酸由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度(A_{260})の値から、当該溶液には、250 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度(A_{260})と波長280nmにおける吸光度(A_{280})との比(A_{260}/A_{280})〕は1.9であった。さらに、単離された核酸を1.4%アガロースゲル中において電気泳動し、エチジウムブロコイドにより染色し、50~20Kbpの核酸の存在を確認した。

【0056】〈実施例6(核酸含有材料からの核酸の単離)〉10⁷培養細胞(HeLa)溶液を、5300rpm、10分間の条件で遠心分離処理し、その上澄み除去した。得られた固形物(細胞ペレット)に5Mグアニジウムチオシアネート/20%フェノール/TE/1.0%SDS溶液(核酸抽出用溶液)1ミリリットルを添加した後、ボルテックスミキサーにより3分間攪拌し、次いで、実施例4と同様にして調製した磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液0.1ミリリットルを添加し、室温で10分間攪拌混合した。その後、実施例4と同様にして核酸抽出用溶液から磁性シリカ粒子Aを分離・回収した。回収した磁性シリカ粒子Aを1MNaClO₄溶液で洗浄した後、蒸留水0.1ミリリットルに分散させ、ボルテックスミキサーにより1分間攪拌した後、磁

性シリカ粒子Aを磁石により分離させ、溶液を回収した。この溶液の吸収スペクトルを測定したところ、核酸由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度(A_{260})の値から、当該溶液には、325 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度(A_{260})と波長280nmにおける吸光度(A_{280})との比(A_{260}/A_{280})〕は1.8であった。

【0057】回収された核酸溶液10マイクロリットルに、20unitのDNaseと反応緩衝液10マイクロリットルと蒸留水80マイクロリットルを添加し、37℃で2時間反応させた。得られた反応溶液にイソプロピルアルコール1.5ミリリットルを添加した後、-80℃で30分間放置した。次いで、1500rpm、10分間の条件で遠心分離処理した後、沈殿物を回収してTE緩衝液25マイクロリットルに溶解した。この溶液をフォルムアシッドで変性処理した1%アガロースゲル中において電気泳動した後、「SYBR Green II」により染色したところ、リボゾームRNAに由来する18s-rRNAおよび28s-rRNAが認められた。

【0058】〈実施例7(核酸含有材料からの核酸の単離)〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例2で得られた磁性シリカ粒子Bの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例4と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、DNA由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度(A_{260})の値から、当該溶液には、53 μ gのDNAが含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度(A_{260})と波長280nmにおける吸光度(A_{280})との比(A_{260}/A_{280})〕は2.1であった。さらに、単離されたDNAを1.4%アガロースゲル中において電気泳動し、エチジウムブロコイドにより染色し、長さ50~20KbpのDNAのスメアーバンドの存在を確認した。

【0059】〈実施例8(核酸含有材料からの核酸の単離)〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例3で得られた磁性シリカ粒子Cの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例4と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、DNA由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度(A_{260})の値から、当該溶液には、78 μ gのDNAが含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度(A_{260})と波長280nmにおける吸光度(A_{280})との比(A_{260}/A_{280})〕は1.9であった。さらに、単離されたDNAを1.4%アガロースゲル中において電気泳動し、エチジウムブロコイドにより染色し、長さ50~20KbpのDNAのスメアーバンドの

存在を確認した。

【0060】〈実施例9（核酸含有材料からの核酸の単離）〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例2で得られた磁性シリカ粒子Bの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例5と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、核酸由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）の値から、当該溶液には、150 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）と波長280nmにおける吸光度（ A_{280} ）との比（ A_{260}/A_{280} ）〕は1.9であった。

【0061】〈実施例10（核酸含有材料からの核酸の単離）〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例3で得られた磁性シリカ粒子Cの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例5と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、DNA由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）の値から、当該溶液には、193 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）と波長280nmにおける吸光度（ A_{280} ）との比（ A_{260}/A_{280} ）〕は2.0であった。

【0062】〈実施例11（核酸含有材料からの核酸の単離）〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例2で得られた磁性シリカ粒子Bの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例6と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、核酸由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）の値か

ら、当該溶液には、284 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）と波長280nmにおける吸光度（ A_{280} ）との比（ A_{260}/A_{280} ）〕は1.9であった。また、回収された核酸溶液を用い、実施例5と同様にして、電気泳動および染色を行ったところ、リボゾームRNAに由来する18s-rRNAおよび28s-rRNAが認められた。

【0063】〈実施例12（核酸含有材料からの核酸の単離）〉磁性シリカ微粒子Aの10重量%分散液の代わりに、実施例3で得られた磁性シリカ粒子Cの10重量%分散液を用いたこと以外は、実施例6と同様の操作を行った。得られた溶液の吸収スペクトルを測定したところ、核酸由来の吸収ピークが認められた。そして、この溶液の波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）の値から、当該溶液には、319 μ gの核酸が含有されていることが確認され、その純度〔波長260nmにおける吸光度（ A_{260} ）と波長280nmにおける吸光度（ A_{280} ）との比（ A_{260}/A_{280} ）〕は1.9であった。また、回収された核酸溶液を用い、実施例5と同様にして、電気泳動および染色を行ったところ、リボゾームRNAに由来する18s-rRNAおよび28s-rRNAが認められた。

【0064】

【発明の効果】本発明の核酸結合用磁性シリカ粒子は、分散安定性および磁気分離性に優れ、核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができ、しかも、高い生産性を有するものである。本発明の核酸単離方法によれば、核酸を含有する材料から高い効率でかつ高い純度で単離することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
// C01G 49/00

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テーム（参考）
A

(72)発明者 范 可君
東京都中央区築地2丁目11番24号 ジェイエスアール株式会社内

Fターム（参考） 4B024 AA20 CA01 CA11 HA11 HA20
4B029 AA09 AA27 BB20 HA10
4C057 AA10 MM02 MM04
4G002 AA03 AA04 AD04 AE02
4G072 AA38 AA41 BB05 GG01 TT05
UU30